

No. d'enregistrement
au CNRS AO 592I

Article principal
Recouvrant en partie

LA THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES
présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE PARIS

par

Madame Henriette VAINER
pour obtenir
le grade de Docteur Es - Sciences

Sujet de la Thèse :

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES ACTIVITES DE BIOSYNTHESE
DE LA PLAQUETTE SANGUINE HUMAINE.
LE GLYCOGENE ET LA GLYCOGENE SYNTHETASE DES PLAQUETTES ET
DES POPULATIONS PLAQUETTAIRES
D'AGES DIFFERENTS.

Soutenue le 21 JUIN 1971 devant la Commission d'examen:

Mlle le Professeur E. LE BRETON , Président
MM le Professeur J. BERNARD , Membre invité
le Professeur M. PASCAUD Examineurs
le Professeur Agr. J. CAEN



Digitized by the Internet Archive
in 2026



ÉTUDE SUR LA BIOSYNTHÈSE DU GLYCOGÈNE PLAQUETTAIRE

IV. — L'ÉTAT DU GLYCOGÈNE PARTICULAIRE DES PLAQUETTES SANGUINES HUMAINES *

Henriette VAINER **, Christine JEANNEAU *** et Jacques CAEN

*Département d'Hémostase, Institut de Recherches sur les Maladies du Sang
(dir. : Prof. Jean Bernard), Hôpital Saint-Louis, Paris (10^e)*

INTRODUCTION

La presque totalité du glycogène des cellules sanguines se trouve dans les granulocytes neutrophiles (19, 22, 23) et dans les plaquettes sanguines où sa présence a été signalée à l'état dispersé dans le cytoplasme (10, 13), dans le voisinage des vésicules et des structures microfibrillaires (2, 6, 13), à l'intérieur des mitochondries (8) ou associé à une gamma-globuline (3).

Dans le cadre de nos études sur la biosynthèse du glycogène dans les plaquettes sanguines (24, 25), nous présentons dans ce travail nos résultats sur la localisation et l'isolement du glycogène particulaire par la méthode de précipitation-centrifugation différentielle à pH acide et à basse température selon Drochmans (7).

* Travail effectué partiellement dans le cadre d'un contrat de recherches D.G.R.S.T. 68 01 317.

** Chargée de recherches à l'I.N.S.E.R.M. (dir. : Prof. Burg).

*** Attachée de recherches au C.N.R.S. (dir. : Prof. Curien).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le sang de donneurs normaux est prélevé à la veine du pli du coude sur anticoagulant ACD (1 partie pour 9 parties de sang) en sacs plastique. Il est centrifugé 15 minutes à 7 °C à 100 x g. Le plasma riche en plaquettes (PRP) surnageant est décanté. A partir du PRP, les plaquettes sont isolées par centrifugation à 7 000 x g 20 minutes à 7 °C et lavées en milieu salin (150 mM NaCl) contenant 1 mM EDTA pH 7.4. La suspension plaquettaire n'est pratiquement contaminée ni d'érythrocytes, ni de leucocytes. L'homogénat plaquettaire (10 %) (g/v) est préparé en milieu de saccharose 250 mM en tampon Tris-HCl 10 mM pH 7.4 et soumis au fractionnement par centrifugation différentielle et à l'ultracentrifugation en gradient linéaire de saccharose (17). Le glycogène est dosé par la méthode à l'anthrone avec standard de glucose (23) : pour le glycogène total, après digestion alcaline à chaud (KOH 30 % 30 minutes 100 °C) et pour la fraction acidosoluble dans les extraits trichloracétiques (10 % TCA 0 °C) ; dans les deux cas, après 3 réprécipitations par l'éthanol à 66 % de concentration finale. Les protéines ont été dosées par la méthode de Lowry (16) avec standard d'albumine cristallisée.

Préparation du glycogène particulière : les plaquettes ainsi isolées ont été homogénéisées à 0 °C en tampon phtalate 100 mM pH 4.8 (1 g poids humide/5 ml de tampon) selon Drochmans (7). L'hydrolyse acide du glycogène purifié (HCl 0.6 N, 2 h à 100 °C) et la digestion enzymatique en tampon phosphate salin 100 mM pH 7.0 (α -amylase pancréatique cristallisée 10 μ g/ml et incubation 30 minutes à 37 °C) ont été réalisées par chromatographie sur plaques de Kieselgel (Merck) et dosage des sucres réducteurs (18). Nous avons utilisé le mélange butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5) (v/v) comme liquide d'irrigation ; la révélation des sucres a été faite par le phtalate d'aniline et la benzidine et celle des acides aminés par la ninhydrine en chloroforme-collidine (100 : 1) (v/v).

Pour l'examen en microscopie électronique les préparations fraîches de glycogène purifié ont été fixées à l'acide phosphotungstique à 3 % g/v, pH 7.2 pendant 3 minutes à 20 °C sur grilles recouvertes de formvar (Mesh 200 SR Janning) au microscope Siemens Elmiskop I à des grossissements directs de 60 000 et 80 000 $\times$ (7).

Tous les réactifs ont été des produits E. Merck AG. Darmstadt ou Sigma Chemical Cy., St Louis, Mo. Les plaques finies de gel de silice F 254 pour CCM, 20 $\times$ 20 cm $\times$ 0,25 mm ont été obtenues chez E. Merck AG, Darmstadt.

RÉSULTATS

Les plaquettes contiennent $58 \pm 10 \mu$ g de glycogène/mg de protéines dont 66 % du total ($38,2 \pm 8 \mu$ g) sont extractibles par le TCA, le tiers restant fermement lié aux structures plaquettaires.

Au cours du fractionnement de l'homogénat plaquettaire, 60 % du glycogène plaquettaire de l'homogénat se retrouvent dans le surnageant 7 000 g. A partir du surnageant 7 000 g, 92 % du glycogène sont récupérés dans le sédiment 105 000g et on obtient ainsi un précipité d'aspect gélatineux, jaunâtre, translucide.

Par ultracentrifugation en gradient de densité (17), le taux le plus élevé de glycogène se trouve dans les fractions de densité 1,18-1,20 (Figure 1) et dans le sédiment au fond du tube. Le glycogène isolé selon

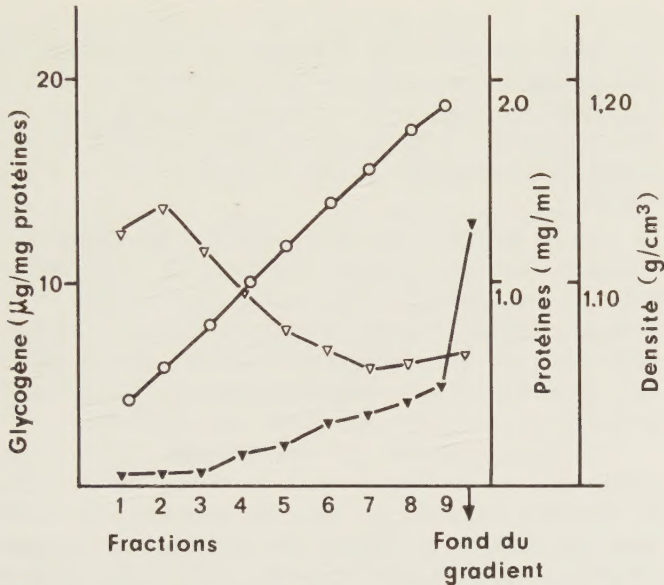


FIGURE 1. Distribution du glycogène dans les fractions isolées par ultracentrifugation en gradient de densité d'un homogénat de plaquettes humaines.

▲, Glycogène ; Δ, Protéines totales ; ○, densités à 20 °C.

la méthode de Drochmans (7) contient 7 à 8 % de protéines contaminées. Cette préparation produit une augmentation de l'absorption à 280 mμ, mais non à 260 mμ ; elle ne contient pas, en outre, de sucres réducteurs libres (18). Après hydrolyse acide et enzymatique à l'α-amylase, on n'identifie en chromatographie en couche mince que du glucose et des traces de composés ninhydrine-positifs.

Après coloration négative en couche mono-particulaire, les micrographies (Pl. I, fig. a, b) montrent des préparations pures, dépourvues de toute autre ultrastructure. Les particules de glycogène apparaissent claires sur le fond sombre de phosphotungstate ; elles sont en général sphériques,

d'un diamètre moyen de 30 à 40 μ m (particules bêta) ; les particules bêta apparaissent constituées de 18 à 20 sous-unités (particules gamma, selon Drochmans [7]), en général rondes, donnant l'aspect mûriforme à la particule bêta. Rarement de petits filaments réunissent ces particules gamma.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Dans les plaquettes humaines, la fraction extractible par l'acide trichloracétique à basse température représente 66 % du glycogène total. La fraction de glycogène plaquettaire acido-soluble ainsi retrouvée est très rapprochée de celle trouvée dans le muscle strié (4). Ainsi la comparaison entre plaquette et muscle strié retrouve-t-elle une nouvelle confirmation.

La mise en évidence d'une fraction de glycogène « libre » ou extractible par les acides et d'une fraction « liée » résiduelle ne peut encore être reliée à son mode d'utilisation par la plaquette. Mais on peut admettre pour la plaquette comme pour le muscle (4, 5) que la fraction de glycogène libre est plus facilement mobilisée que le glycogène résiduel dans des conditions d'activités métaboliques accrues lorsque, en réponse à certains stimuli, son catabolisme doit s'effectuer.

Le fractionnement par centrifugation différentielle et par ultracentrifugation en gradient linéaire de saccharose retrouve le glycogène dans le sédiment 105 000 g et dans les fractions de densité 1,18-1,20. Cette fraction contient, en dehors des granules de glycogène, plusieurs types de granules plaquettaires et de fragments membranaires révélés à l'examen en microscopie électronique (2, 10, 13). Associées à ces structures, nous avons retrouvé la presque totalité de l'activité de l'Uridine-diphosphoglucose-glycogène-transférase (glycogène synthétase) (UDPG- α -1,4-glucose- α -4-glucosyl transférase E.C.2.4.1.11.), dépendante et indépendante de glucose-6-phosphate (25). Cette même fraction possède le maximum (60 - 80 %) du total de l'activité cytochrome-oxydase (E.C.1.9.3.1.), enzyme marqueur des mitochondries. Il s'agit, cependant, d'une fraction hétérogène car des enzymes de type lysosomal (17) : la phosphatase acide (E.C.3.1.3.2.), la N-acétylglucosamine (E.C.3.2.1.30.), la bêta-glucuronidase (E.C.3.2.1.31.) et la ribonucléase acide (E.C.2.7.7.16.) ont été retrouvées (Vainer, non publié) quoique à des valeurs moyennes inférieures à celles déterminées dans les fractions plus légères (densité 1,10-1,12). La présence de glycogène a été signalée dans les structures subcellulaires (mitochondries et microsomes légers), provenant de tissus de diverses origines (1, 12) et dans la plaquette elle-même (8). Par ailleurs, des activités enzymatiques

qui régissent l'anabolisme (15, 25) ou la dégradation du glycogène (1, 27) se retrouvent associées au glycogène.

Ainsi, la présence simultanée de glycogène, d'enzymes liés au métabolisme glucidique et d'éléments ultrastructuraux mixtes suggère des liens plus ou moins étroits entre ces divers constituants plaquettaires comme c'est le cas pour d'autres cellules. Le glycogène est vraisemblablement une source endogène d'énergie, nécessaire au maintien de l'intégrité et de la viabilité de la plaquette puisque les plaquettes jeunes ont le taux le plus élevé de glycogène et la capacité la plus haute de synthèse du polysaccharide (14, 26).

L'ultrastructure du glycogène apparaît identique dans la plaquette intacte (2, 10), ou en voie de libérer son contenu (11), ou dans les fractions que nous avons isolées. Les préparations de glycogène apparaissent être remarquablement pures puisque aucune autre ultrastructure n'est observée. La coloration négative en microscopie électronique révèle la présence de particules de diamètre moyen de 30 à 40 m μ (particules bêta) constituées de 18 à 20 sous-unités (particules gamma). Les diamètres moyens des particules bêta du glycogène particulaire plaquettaire sont de l'ordre de grandeur des particules bêta du glycogène du muscle strié (7) et leucocytaire (23, 29). Il est possible que les protéines, qui contaminent nos préparations de glycogène plaquettaire purifié, non retrouvées en microscopie électronique, soient en partie des protéines enzymatiques (27) que nous n'avons pas encore réussi à mettre en évidence.

RÉSUMÉ

Les plaquettes humaines contiennent 58 ± 10 μ g de glycogène/mg de protéines dont 60 % sont extractibles par le TCA. Par ultracentrifugation en gradient linéaire de saccharose, le taux le plus élevé de glycogène a été retrouvé dans les fractions de densité 1,18-1,20. L'examen en microscopie électronique a montré la conservation de la structure des particules de glycogène à côté de granules intraplaquettaires de types divers dans les mêmes fractions. Le glycogène particulaire contient 7 à 8 % des protéines probablement adsorbées que l'examen ultrastructural, après coloration négative ne révèle pas. Les particules bêta de glycogène plaquettaire de taille relativement uniforme ont un diamètre moyen de 30 à 40 m μ et apparaissent constituées de 18 à 22 sous-unités.

L'ultrastructure du glycogène purifié, particulaire, plaquettaire est semblable à celle du glycogène particulaire du muscle, du foie et des leucocytes.

SUMMARY

The human platelet glycogen (58 ± 10 μ g/mg protein) is partially acid-extractible (38.2 ± 8 μ g/mg protein). 60 % of the total glycogen content is isolated in a 7,000 g fraction by differential centrifugation, 92 % of which is recovered

in a 105,000 g sediment. In a continuous sucrose gradient, the richest glycogen fraction is localized at 1.18 - 1.20 densities. The glycogen particles maintain its ultrastructure in the intact and injured platelet as well as in isolated platelet fractions.

The precipitation-centrifugation method of Drochmans at low pH and temperature was successfully applied in the first isolation of platelet particulate glycogen. The electron-micrographs after negative staining reveal the macromolecular structure of particulate platelet glycogen as rather round particles 30 - 40 m μ in diameter that consist in 18 - 22 subunits which are regularly dispersed similar to liver, leucocytes and muscle purified particulate glycogen.

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDERSON W.A. et PERSONNE P., 1970. The localization of glycogen in the spermatozoa of various invertebrate and vertebrate species. *J. Cell Biol.*, **44**, 29-51.
2. BETTEX-GALLAND M., LUSCHER E.F. et WEIBEL E.R., 1969. Thrombosthenin - Electron microscopic studies on its localization in human blood platelets and some properties of its subunits. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **22**, 431-449.
3. BEZKOROVANY A. et RAFELSON M.E., 1964. Characterization of some proteins from normal human platelets. *J. Lab. Clin. Med.*, **64**, 212-215.
4. BLOOM W.L., LEWIS G.T., SCHUMPERT M.Z. et SHEN T.M., 1951. Glycogen fractions of liver and muscle. *J. Biol. Chem.*, **188**, 631-640.
5. BLOUNT H.D., 1966. Influence of restricted food intake on cardiac glycogen mobility. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **122**, 148-150.
6. BULL B.S., 1966. The ultrastructure of negatively stained platelets. Some physiologic implications. *Blood*, **28**, 901-912.
7. DROCHMANS P., 1962. Morphologie du glycogène. Etude au microscope électronique de coloration négatives du glycogène particulaire. *J. Ultrastructure Res.*, **6**, 141-163.
8. GRATCHEVA A.J. et LYSSOGOROV N.V., 1968. Etude au microscope électronique de la distribution du glycogène dans les plaquettes (texte en russe). *Tsitologia E*, **7**, 889-891.
9. GROSS R., 1961. Metabolic aspects of normal and pathologic platelets. In : *Blood Platelets*. Johnson S.A., Monto R.W., Rebuck J.W. and Horn R.C., Little Brown and Co., Boston, p. 407.
10. HOVIG T., 1968. The ultrastructure of blood platelets in normal and abnormal states. *Ser. Haemat.*, **1**, 3-64.
11. HUGUES J., 1969. Plaquettes sanguines et structure du vaisseau. *Nouv. Rev. Fr. Hémat.*, **9**, 529-549.
12. ISHIKAWA T. et PEI Y.F., 1965. Intramitochondrial glycogen particles in Rat retinal receptor cells. *J. Cell Biol.*, **25**, 402-407.

13. JEAN G. et RACINE L., 1962. Ultrastructure of normal human thrombocytes. *Proceed. 5th International Congress Electron Microscopy*, Acad. Press, Philadelphie. p. 00.8.
14. KARPATKIN S., 1969. Heterogeneity of human platelets. I. Metabolic and kinetic evidence suggestive of young and old platelets. *J. Clin. Invest.*, **48**, 1073-1082.
15. LELOIR L.F., OLAVARIA J.M., GOLDENBERG H.S. et CARMINATTI H., 1959. Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. *Arch. Biochem. Biophys.*, **81**, 508-520.
16. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR L.L. et RANDALL R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **163**, 265-275.
17. MARCUS A.J., ZUCKER-FRANKLIN D., SAFIER B.L. et ULLMAN L.A., 1966. Studies on human platelet granules and membranes. *J. Clin. Invest.*, **45**, 14-28.
18. NELSON N., 1955. In : *Methods in enzymology*. Colowick S.P. and Kaplan N.O., ed., Acad. Press, Inc. Publishers, New York, **L**, p. 235.
19. OLSSON J., DAHLQUIST A. et NORDEN A., 1963. Glycogen content of leucocytes and platelets. *Acta Med. Scand.*, **194**, 123-127.
20. SCOTT R.B., 1967. Activation of glycogen phosphorylase in blood platelets. *Blood*, **30**, 321-330.
21. SCOTT R.B., 1968. Glycogen in human peripheral blood leukocytes. I. Characterization of the synthesis and turnover of glycogen *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, **47**, 344-352.
22. SCOTT R.B. et STILL W.J.S., 1968. Glycogen in human peripheral blood leukocytes. II. The macromolecular state of leukocyte glycogen. *J. Clin. Invest.*, **47**, 353-359.
23. SEIFTER S.S., DAYTON B.B. et MINTWYLER E., 1950. Estimation of glycogen with anthrone reagent. *Arch. Biochem. Biophys.*, **25**, 191-200.
24. VAINER H. et WATTIAUX R., 1968. Glycogen synthetase activity in blood platelets. *Nature (Lond.)*, **217**, 951-952.
25. VAINER H. et CAEN J., 1969. Biosynthèse du glycogène dans les plaquettes sanguines humaines. Etude de quelques propriétés de la glycogène synthétase. *C.R. Acad. Sc.*, **268**, 2158-2161.
26. VAINER H., LUKASIEWICZ H., JEANNEAU C. et CAEN J., 1970. Studies on the biosynthesis of platelets glycogen. V. Distribution of glycogen synthetase activity in human platelet populations. *B.B.A.* (soumis pour publication).
27. WANSON J.C. et DROCHMANS P., 1968. Detection of phosphorylase with the electron microscope. In : *Control of glycogen metabolism*, F.E.B.S. Proceedings of the fourth Meeting in Oslo, 1967. N.J. Whelan, ed., Acad. Press, New York, p. 169.

28. WANSON J.C. et TIELEMANS L., 1969. Le glycogène du leucocyte du Lapin : sa morphologie, son isolement, ses caractéristiques biochimiques (résumés). Colloque Suisse de Microscopie Electronique, Lausanne, p. 92.

Manuscrit reçu le 13 mars 1970.

Planche I

Fig. a et b. — Le glycogène plaquettaire (plaquettes humaines) purifié selon Drochmans à l'état particulaire. Coloration négative au phosphotungstate 3 % pH 7,2. Les granules de glycogène apparaissant isolés ou en petits amas. Aucune autre ultrastructure n'est visible. Fig. a, $\times 150\,000$; fig. b, $\times 400\,000$.

